

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
16 janvier 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/005037 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/68, C12Q 1/37, G01N 33/566

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : APOH
TECHNOLOGIES SA [FR/FR]; 911, avenue Agropolis,
F-34000 Montpellier (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/02292

(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : STEFAS,
Elie [FR/FR]; 94, allée des Fauvettes, F-34280 La
Grande-Motte (FR).

(22) Date de dépôt international : 2 juillet 2002 (02.07.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(74) Mandataire : ABELLO, Michel; Cabinet Peuscet, 78,
avenue Raymond Poincaré, F-75116 Paris (FR).

(26) Langue de publication : français

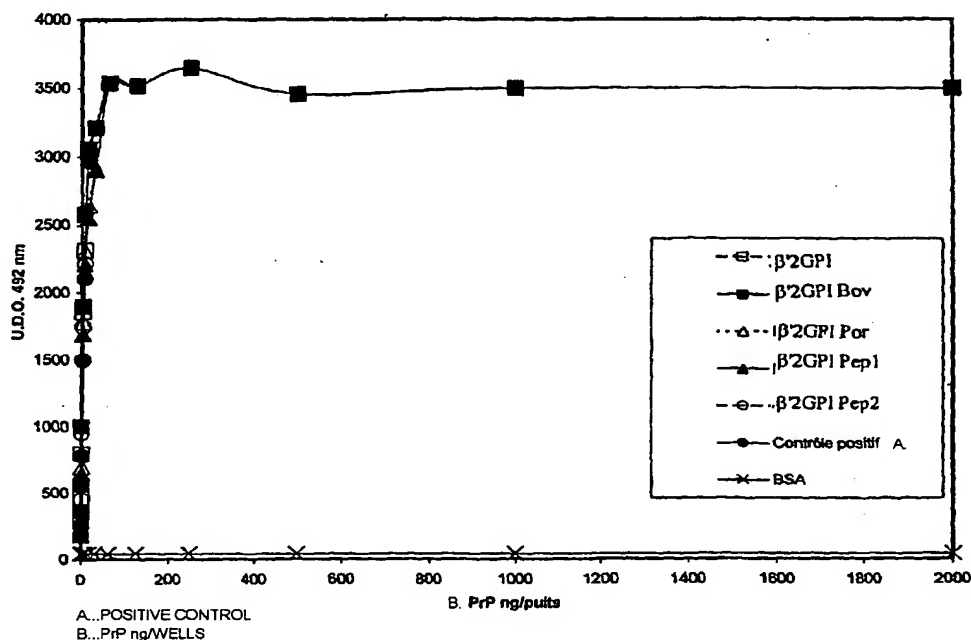
(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,

(30) Données relatives à la priorité :
01/08797 3 juillet 2001 (03.07.2001) FR

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING AND/OR DETECTING AND/OR IDENTIFYING AND/OR QUANTIFYING PRION
PROTEINS

(54) Titre : PROCEDE DE SEPARATION ET/OU DETECTION ET/OU IDENTIFICATION ET/OU QUANTIFICATION DE
PROTEINES PRIONS



(57) Abstract: The invention concerns a method for separating and/or detecting and/or identifying and/or quantifying in a biological material at least a prion protein (PrP), characterised in that it comprises a step which consists in separating and/or detecting and/or identifying and/or quantifying a (PrP/β2GPI) complex consisting of at least a prion protein bound to at least a form of β2GPI.

[Suite sur la page suivante]



WO 03/005037 A1



LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion (PrP), caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/ β 2GPI) formé d'au moins une protéine prion liée à au moins une forme de β 2GPI.

PROCÉDÉ DE SÉPARATION ET/OU DÉTECTION ET/OU IDENTIFICATION ET/OU QUANTIFICATION DE PROTÉINES PRIONS

La présente invention concerne un procédé de séparation
5 et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification de protéines prions, responsables de maladies neurodégénératives, dans divers matériaux biologiques.

Les prions font partie des "agents transmissibles non conventionnels" (ATNC) et sont impliqués dans des maladies
10 rencontrées chez l'homme et les animaux. Il s'agit d'agents responsables de maladies neurodégénératives regroupées sous le nom d'encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST). Ces encéphalopathies, reliées aux prions, incluent la tremblante du mouton et de la chèvre, l'encéphalopathie bovine ou maladie de la vache folle, la
15 maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, les encéphalopathies des visons et des chats, chez l'animal, la maladie de Creutzfeld-Jacob (MJC), le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), le kuru et l'insomnie familiale fatale, chez l'homme (Les virus transmissibles de la mère à l'enfant, Ed. John Libbey Eurotext,
20 1999, Ermias D. Belay, Annu. Rev. Microbiol., 1999, 53: 283-314).

Ces maladies, toujours mortelles, posent un grave problème de santé publique notamment du fait des difficultés que l'on rencontre pour l'identification et la détection précoce de ces agents. Il y a donc une forte demande relative à des procédés fiables de diagnostic et de mesures
25 thérapeutiques efficaces, de ces agents transmissibles non conventionnels.

Ces maladies semblent être causées par la transition post-traductionnelle et conformationnelle d'une protéine prion cellulaire, normale, ci-après désignée PrP^C, en une forme pathogénique, anormale, ci-après désignée PrP^{SC} (Cohen F.E. and Prusiner S.B., Annu. Rev. Biochem., 1998, 67: 793-819).
30

La forme cellulaire normale de la protéine prion est une glycoprotéine de surface cellulaire, hautement conservée et exprimée par un large spectre de cellules, en particulier par des cellules neuronales. Sa
35 présence est indispensable pour que la maladie puisse se produire. Dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles, cette molécule est

convertie en une forme modifiée, du point de vue conformationnel, présentant une résistance partielle à la protéolyse. Ainsi, dans le cerveau des animaux ou des humains présentant des ESST, on observe une accumulation de PrP^{SC} anormale sous forme de fibrilles et dans certains cas sous forme de dépôts amyloïdes dans les cellules. Cette PrP^{SC} anormale a un poids moléculaire compris entre 33 et 35 kDa avant protéolyse et a un poids moléculaire compris entre 27 et 30 kDa après action de la protéinase K : cette résistance à la protéinase K permet de différencier la PrP^{SC} de la PrP^C qui est détruite par l'action de ladite protéinase. Des études biophysiques ont également démontré que la PrP^C contient un nombre élevé d'hélices α (42%) et très peu de feuillets β , alors qu'au contraire la forme PrP^{SC} contient moins d'hélices α (30%) et un nombre élevé de feuillets β (43%) et a une tendance à se polymériser sous forme de fibrilles amyloïdes (Cohen F.E. and Prusiner S.B., Annu. Rev. Biochem., 1998, 67: 793-819). La protéine prion, désignée d'une manière générale par PrP, est également caractérisée par son affinité pour les polyanions polysulfatés tels que l'héparine sulfate et le dermatan sulfate (Brimacombe B. et al., Biochem. J., 1999, 342: 605-613).

On sait que la β 2-glycoprotéine I, ci-après en abrégé β 2GPI, est une glycoprotéine plasmatique, dont la séquence a été notamment indiquée dans les articles de J. LOZIER et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, pages 3640-3644, Juillet 1984 et de T. KRISTENSEN et coll., FEBS Letters, Vol. 289, 1991, pages 183-186. La β 2GPI est également appelée Apolipoprotéine H (APOH). Il a été constaté que cette protéine présente un polymorphisme structural : la dénomination β 2GPI sera ci-après considérée comme générique pour toutes les formes.

Ce polymorphisme structural est sous contrôle génétique comme ceci a été notamment indiqué dans l'article de DK. SANGHERA et coll., Hum. Genet., Vol. 100, 1997, pages 57-62. Il est dû à la présence de quatre allèles: trois allèles fréquents (APOH*1, APOH*2 et APOH*3) et un allèle rare (APOH*4). L'allèle APOH*3 a été par la suite sous-typé en APOH*3^W et APOH*3^D en se basant sur sa réactivité avec un anticorps monoclonal 3D11. Ce polymorphisme est dû à plusieurs substitutions dans la région ADN codant pour l'APOH telles que Ser88Asn (DK. SANGHERA et coll., Hum. Genet., Vol. 100, 1997, pages 57-62), Val247Leu (A. STEINKASSERER et coll., Hum. Genet.,

Vol. 91, 1993, pages 401-402), Cys306Gly (DK. SANGHERA et coll., Hum. Mol. Genet., Vol. 6, 1997, pages 311-316), et Trp316Ser (DK. SANGHERA et coll., Hum. Genet., Vol. 100, 1997, pages 57-62 et DK. SANGHERA et coll., Hum. Mol. Genet., Vol. 6, 1997, pages 311-316).

- 5 Les mutations Ser88Asn et Trp316Ser correspondent aux allèles APOH*1 et APOH*3^W respectivement. La forme β 2GPI décrite dans FR-2 701 260 B1 résulte de la mutation Thr318Ser.

La β 2GPI est connue comme une glycoprotéine ayant une forte affinité pour les phospholipides anioniques tels que la cardiolipine
10 (H. WURM, Int. J. Biochem., Vol. 16, 1984, pages 511-515).

Dans la demande internationale WO 94/18569, on a indiqué que des composés viraux se fixaient de façon spécifique sur une forme de β 2GPI, à savoir celle décrite dans la demande de brevet français 2 701 263, que cette forme de β 2GPI soit à l'état pur ou dans une
15 composition protéinique la contenant ; cette forme de β 2GPI est isolée à partir du résidu fixé sur la (les) colonne(s) de chromatographie d'affinité utilisée(s) dans le procédé de purification de l'albumine du plasma sanguin décrit dans FR-A-2 690 444 ; elle a un poids moléculaire de 50 000 \pm 3 000 daltons.

20 On a formulé l'hypothèse que la liaison de la β 2GPI à des composés viraux pourrait impliquer les phospholipides présents sur ces composés (H. MEHDI et coll., J. Virol., Vol. 68 (4), 1994, pages 2415-2424, AR.NEURATH et coll., Virology, Vol. 204 (1), 1994, pages 475-477, E. STEFAS et coll., AIDS Res. Hum. Retr., Vol. 13 (1), 1997, pages 97-104, E. STEFAS et coll., Hepatology, Vol. 33 (1), 2001, pages
25 207-217). Il a également été décrit que la β 2GPI sert de cofacteur pour la liaison des anticorps anti-phospholipides aux phospholipides anioniques (M. GALLI et coll., Lancet, Vol. 335 (8705), 1990, pages 1544-1547, HP. McNEIL et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87 (11), 1990, pages 4120-4124). On a aussi émis l'hypothèse, dans la littérature, que les résidus lysine de la β 2GPI étaient responsables de la liaison de cette
30 dernière aux phospholipides anioniques (Steinkasserer A. et coll., Biochemical Journal, 1991, 277 (Pt 2) : 387-391) ; cette hypothèse était confortée par le fait que la modification desdits résidus lysine par carbamylation abolissait sa liaison aux phospholipides (Arvieux J. et
35

coll., Thrombosis and Haemostasis, 70 (2), 1993: 336-341, Kertesz Z. et coll., Biochemical Journal, 310, 1995 : 315-321).

Il semble, en conséquence, que la liaison entre un composé infectieux et la $\beta 2\text{GPI}$ fait intervenir des interactions protéine-phospholipide, ainsi que d'autres types de liaison, notamment basés sur des interactions protéine-protéine.

Il apparaît clairement, à partir des données de la littérature médicale, qu'il y a un besoin urgent de développer des méthodes d'isolement, d'identification et de diagnostic d'agents pathogènes tels que des protéines prions anormales PrP^{SC} , causant des maladies connues ainsi que des maladies émergentes, et des méthodes d'isolement, d'identification de protéines prions normales PrP^{C} dont les PrP^{SC} dérivent. Ces méthodes permettront à terme de mieux connaître ces agents pathogènes ainsi que les mécanismes qu'ils mettent en jeu pour infecter des organismes vivants.

Par conséquent, le but de la présente invention est de fournir :

- un procédé de séparation de protéine prion d'un matériau biologique, et/ou
- un procédé d'isolement et purification de protéine prion, et/ou
- un procédé de détection de protéine prion dans un matériau biologique, et/ou
- un procédé d'identification de protéine prion dans un matériau biologique, et/ou
- un procédé de quantification de protéine prion dans un matériau biologique.

Selon l'invention, on a constaté que, de façon surprenante et inattendue, des protéines prions PrP peuvent être séparées et/ou détectées et/ou identifiées et/ou quantifiées par l'intermédiaire de leur liaison aux différentes formes de $\beta 2\text{GPI}$. Le terme de "liaison" indique que ces PrP sont physiquement connectées à, et interagissent avec, les différentes formes de $\beta 2\text{GPI}$. Cette liaison peut être démontrée par n'importe quel procédé ou essai connu en la matière tels que les essais utilisant la biotine et l'avidine ou la streptavidine, de type immunoenzymatique, de type ELISA ou Immunoblot, de type radioimmunologique, de type RIA, des essais de compétition, des essais d'agglutination, des essais

d'immunoprécipitation, des essais de chromatographie... De façon générale, on appellera ici "complexe" une association directe ou indirecte, entre au moins une PrP, normale ou anormale, et au moins une forme de β 2GPI ; ces complexes seront, de façon générale, désignés ci-après par la notation "PrP/ β 2GPI".

Dans la présente demande de brevet, on entend, de façon générique, par PrP aussi bien les composés protéiniques, constitutifs d'une PrP, que des particules de type PrP. Les particules de type PrP sont, soit des PrP complètes ou incomplètes, soit des parties de PrP, soit des assemblages contenant des composés constitutifs de PrP, qui présentent certaines propriétés des PrP ou des composés PrP, en particulier, celles d'être détectées par certains anticorps spécifiques de composés PrP.

Selon la présente invention, on entend par "matériau biologique", un tissu biologique, une préparation ou un extrait issu du tissu biologique, liquide ou solide, ou un milieu naturel, liquide ou solide, susceptible de contenir ou porter une PrP au sens ci-dessus défini. Le matériau peut ainsi être un mélange d'au moins deux matériaux tels que ci-dessus définis. Un tel matériau biologique peut donc être, notamment, soit préparé à partir de tissus, d'organes, de selles ou de liquides biologiques d'un malade atteint d'une infection due à une PrP^{SC}, soit obtenu à partir de cultures "in vitro"; un tel matériau biologique peut aussi être un sérum, du plasma, de l'urine, du liquide céphalo-rachidien, du liquide synovial, du liquide péritonéal, du liquide pleural, du liquide séminal, de la salive, des sécrétions gastriques, du mucus, du liquide ascitique ou autres.

La présente invention a donc pour objet un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion (PrP), caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/ β 2GPI) formé d'au moins une protéine prion liée à au moins une forme de β 2-glycoprotéine I (β 2GPI).

Selon une particularité, le procédé comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP^{SC}/ β 2GPI) formé d'au moins une protéine prion

anormale (PrP^{SC}) liée à au moins une forme de β 2GPI, ledit procédé constituant un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion anormale. En particulier on peut utiliser pour
5 former un complexe (PrP^{SC}/ β 2GPI) au moins une protéine prion anormale PrP^{SC} provenant de la tremblante du mouton ou de la chèvre, de l'encéphalopathie bovine, de la maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, des encéphalopathies des visons ou des chats, de la maladie de Creutzfeld-Jacob (MJC), du syndrome de Gerstmann-
10 Straüssler-Scheinker (GSS), du kuru ou de l'insomnie familiale fatale. En outre, on peut utiliser, pour former un complexe (PrP/ β 2GPI), au moins une β 2GPI d'origine humaine, ou d'origine animale, une β 2GPI recombinante, ou une β 2GPI obtenue par synthèse chimique ou une forme modifiée de β 2GPI.

15 Avantageusement, avant l'étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification du complexe (PrP^{SC}/ β 2GPI), on soumet le matériau biologique à l'action de détergents et/ou d'enzymes, en particulier à l'action de la protéinase K.

Selon une première mise en œuvre de l'invention, on réalise
20 une étape de fixation de PrP contenue dans un matériau biologique à au moins une forme de β 2GPI intentionnellement rajoutée audit matériau biologique pour former ledit complexe, suivie d'une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification du complexe (PrP/ β 2GPI).

25 Selon un mode de réalisation, on réalise une étape de fixation sur un support, d'au moins une forme de β 2GPI ou de ladite (ou desdites) PrP, avant ou après l'étape de fixation de ladite (ou desdites) PrP à ladite (ou auxdites) forme(s) de β 2GPI pour former ledit complexe, une étape de séparation consistant à séparer le matériau
30 biologique du support sur lequel est fixé le complexe, une étape de détection et/ou d'identification et/ou de quantification consistant, après ladite étape de séparation, à détecter et/ou à identifier et/ou à quantifier le complexe fixé au support par sa partie qui n'est pas liée au support. Avantageusement, on utilise, comme support, un support solide.

35 Selon une variante de réalisation, la fixation sur le support est réalisée par l'intermédiaire d'un composé se liant à l'une des parties

PrP ou β 2GPI du complexe, ladite étape de détection et/ou d'identification et/ou de quantification consistant à détecter et/ou à identifier et/ou à quantifier le complexe par sa partie qui n'est pas liée au support. Avantageusement, le composé se liant à la β 2GPI ou à la PrP est
5 un anticorps reconnaissant respectivement la β 2GPI ou la PrP, ou bien une autre protéine, un composé biologique, un composé chimique ou un détergent se fixant à la PrP ou à la β 2GPI.

On peut réaliser l'étape de fixation d'au moins une forme de β 2-GPI ou de la (ou des) PrP sur un support, par réaction de groupes
10 réactifs de la (ou des) forme(s) de β 2GPI ou de la (ou des) PrP avec des sites réactifs du support, ladite (ou lesdites) forme(s) étant mise(s) en solution dans un tampon ayant un pH compris entre 2,5 et 10,5, de préférence entre 5,5 et 7,5, pour obtenir une solution ayant une concentration comprise entre 0,01 et 100g/l de forme(s) de β 2GPI ou de
15 PrP, le support étant maintenu en contact avec la solution à une température comprise entre 0° et 40°C pendant un temps d'incubation compris entre 10 secondes et 24 heures, puis la séparation du support et de la solution par lavage du support.

L'étape de fixation d'au moins une PrP à au moins une
20 forme de β 2GPI pour former un complexe peut être réalisée par mise en contact d'au moins une forme de β 2GPI, avec le matériau biologique susceptible de contenir des PrP à une température comprise entre 0° et 50°C, avantageusement voisine de 37°C, pendant une période de temps comprise entre 10 secondes et 24 heures, le matériau biologique étant
25 dilué à l'aide d'un tampon donnant un pH compris entre 3,5 et 10, de préférence compris entre 5,6 et 7,6.

On peut effectuer la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la (ou des) PrP du complexe par des anticorps spécifiques de la (ou des) PrP, ou par des procédés d'infection de cellules
30 ou d'organismes susceptibles à l'infection des PrP ; avantageusement, on effectue la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la (ou des) PrP du complexe par un anticorps reconnaissant spécifiquement un antigène, de préférence de nature protéique, de la (ou des) PrP.

On peut aussi, selon une autre façon d'opérer, effectuer la
35 détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la β 2GPI du complexe par des anticorps spécifiques de la β 2GPI.

Avantageusement, on couple l'anticorps utilisé à un marqueur enzymatique, de l'or colloïdal, à un traceur radioactif, fluorescent ou luminescent. On peut coupler l'anticorps à un marqueur enzymatique, dont l'enzyme est mise en contact avec un substrat spécifique apte à se transformer en un produit coloré.

Quand on fixe le complexe au support par l'intermédiaire de sa partie $\beta 2$ GPI, l'étape de séparation comprend l'isolement de la PrP du complexe fixé au support par un procédé d'élution de chromatographie d'affinité. Avantageusement, ledit isolement est réalisé par élution de la PrP fixée au support solide à l'aide d'un tampon ayant un pH compris entre 2 et 10,5, une concentration en NaCl comprise entre 0 et 5M, de préférence à l'aide d'un tampon glycine-HCl 0,1 mole/litre ayant un pH de 2,5.

Selon une particularité de l'invention, la séparation du support et de la solution est suivie d'une étape de saturation des sites actifs du support, en faisant réagir sur les sites actifs une solution d'albumine sérique bovine ou de caséine.

Selon une autre mise en œuvre de l'invention, le procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'au moins une PrP dans un matériau biologique qui contient naturellement au moins une forme de $\beta 2$ GPI, comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/ $\beta 2$ GPI) formé d'au moins une PrP liée à au moins une forme de $\beta 2$ GPI naturellement présente dans ledit matériau.

Les formes de $\beta 2$ GPI utilisées selon la présente invention, pour former les complexes (PrP/ $\beta 2$ GPI), peuvent, comme ci-dessus indiqué, être d'origine humaine, animale, recombinante, ou obtenues par voie chimique ou des formes modifiées de $\beta 2$ GPI.

Le terme "d'origine humaine" se réfère à n'importe quelle forme naturelle de $\beta 2$ GPI trouvée chez l'homme ou obtenue après culture de cellules humaines, ou à des fragments (combinaison de quelques acides aminés, tels que des polypeptides ou peptides) de celle-ci, obtenus soit en cours de purification, par coupure(s) enzymatique(s) provoquée(s) par des enzymes déjà présentes dans les liquides biologiques, soit après purification à l'aide d'enzymes spécifiques ou non de sites présents sur ces formes naturelles humaines.

Le terme "d'origine animale" se réfère à n'importe quelle forme naturelle de β 2GPI trouvée chez l'animal, ou obtenue après culture de cellules animales, ou à des fragments (combinaison de quelques acides aminés, tels que des polypeptides ou peptides) de celle-ci, obtenus
5 soit en cours de purification, par coupure(s) enzymatique(s) provoquée(s) par des enzymes déjà présentes dans les liquides biologiques, soit après purification à l'aide d'enzymes spécifiques ou non de sites présents sur ces formes naturelles animales.

Le terme "d'origine recombinante" se réfère ou bien à
10 n'importe quelle forme recombinante de β 2GPI obtenue selon les techniques de recombinaison d'ADN telles que décrites par Maniatis (MANIATIS T. et coll., Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982), après insertion du gène, modifié ou non, et recombinaison génétique, ou après
15 modification du gène déjà exprimé par des procédés connus en la matière chez les bactéries ou autres cellules utilisées dans la production de protéines recombinantes, ou bien à des fragments (combinaison de quelques acides aminés, tels que des polypeptides ou peptides) de telles formes recombinantes, obtenus soit en cours de purification, par
20 coupure(s) enzymatique(s) provoquée(s) par des enzymes déjà présentes dans les liquides biologiques, soit après purification à l'aide d'enzymes spécifiques ou non de sites présents sur ces formes recombinantes.

Le terme "modifié" se réfère à n'importe quelle forme naturelle de β 2GPI trouvée chez l'homme ou l'animal, à n'importe quelle
25 forme d'origine recombinante, à n'importe quelle forme obtenue après culture de cellules humaines ou animales, ou encore à des fragments (combinaison de quelques acides aminés, tels que des polypeptides ou peptides) de ces formes, obtenus soit en cours de purification, par
coupure(s) enzymatique(s) provoquée(s) par des enzymes déjà présentes
30 dans les liquides biologiques, soit après purification à l'aide d'enzymes spécifiques ou non de sites présents sur lesdites formes, après que toutes les formes susmentionnées aient subi des modifications, par exemple par voie chimique, de certains de leurs acides aminés, comme par exemple la carbamylation des résidus lysine.

35 Le terme "obtenue par voie chimique" se réfère à n'importe quelle forme de β 2GPI d'origine humaine, animale ou recombinante telle

que définie ci-dessus obtenue par une synthèse chimique. En particulier, les polypeptides et peptides provenant desdites formes de β 2GPI peuvent être préparés selon n'importe quel procédé connu en la matière notamment par synthèse chimique classique comme décrit par Atherton et Shepard dans "Solid phase peptide synthesis", IRL Press, Oxford, 1989. Il est clair que les termes "polypeptides" et "peptides" se réfèrent à un polymère d'acides aminés comprenant moins d'acides aminés que la séquence de la protéine naturelle, mais n'exclut pas les modifications post-traductionnelles des polypeptides et peptides, telles que la glycosylation, l'acylation, la phosphorylation, les modifications avec des acides gras ou autres. Sont également inclus dans la définition, des polypeptides et des peptides avec des substitutions au niveau des acides aminés, des versions mutées ou des variations de la séquence naturelle de ces polypeptides et peptides, des polypeptides et peptides avec des liaisons substituées, des polypeptides et peptides contenant des résidus cystéine reliés par des ponts disulfure, des résidus cystéine sans ponts disulfure, aussi bien que d'autres modifications connues en la matière.

Selon la présente invention, on peut utiliser, comme forme de β 2GPI, la β 2GPI pure ou sous forme de composition protéinique contenant, en particulier, d'autres glycoprotéines. Elle peut ainsi être obtenue :

- à partir du plasma ou autre liquide biologique, par exemple sérum, urine, liquide céphalo-rachidien, humain ou animal, en mettant en œuvre des procédés de purification déjà décrits dans la littérature ou dans le brevet français 2 701 263 ; ou
- à partir du commerce ; ou
- à partir de surnageants de cellules immortalisées qui l'expriment ; ou
- par expression du gène qui la code dans des bactéries ou autres cellules utilisées dans la production de protéines recombinantes ; ou
- par synthèse chimique.

Les formes de β 2GPI peuvent être caractérisées et séquencées selon n'importe quel procédé connu en la matière.

Pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, on peut ou bien effectuer la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de PrP sans fixation préalable du complexe (PrP/ β 2GPI) sur un support ou bien effectuer la séparation et/ou détection et/ou identification et/ou

quantification de PrP avec fixation dudit complexe sur un support par un élément constitutif du complexe ; dans le premier cas, la détection et/ou l'identification et/ou la quantification s'effectue dans le milieu où le complexe s'est formé, soit après fixation dudit milieu par une méthode
5 physique, chimique ou biochimique, par exemple sur une surface, soit sans fixation dudit milieu ; dans le deuxième cas, le support peut, avantageusement, être un support solide, la séparation consistant à séparer le support sur lequel est fixé le complexe, la détection et/ou l'identification et/ou la quantification consistant à détecter et/ou identifier
10 et/ou quantifier le complexe fixé au support après avoir séparé ledit support du matériau biologique.

Le terme "support solide" se réfère à n'importe quel support solide connu en la matière tel qu'un de ceux décrits dans "Current
15 Protocols in Immunology" aux Editions Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E et Strober W., Wiley Interscience, 1992. Ce support peut, par exemple, être une plaque de microtitration type ELISA, une membrane, notamment de nitrocellulose, un gel de chromatographie, des billes, notamment en polystyrène, des tubes, notamment en polystyrène ou polypropylène, ou des cellules vivantes, humaines ou
20 animales ou bactériennes ou virales.

Selon un premier mode de mise en œuvre de l'invention dans le cas où l'on fixe le complexe sur un support, on retient le complexe (PrP/ β 2GPI) sur le support par l'intermédiaire de la partie β 2GPI du complexe ; ensuite, la partie du complexe correspondant à la
25 PrP est détectée/identifiée/quantifiée ou isolée par tout moyen approprié. La fixation de la partie β 2GPI sur le support peut être effectuée après la formation du complexe ou, de préférence, avant la formation du complexe. Si la fixation de la partie β 2GPI est effectuée avant la formation du complexe, ladite fixation sur le support solide se fait par
30 réaction de groupes réactifs de la (ou des) forme(s) de la β 2GPI avec des sites réactifs du support selon n'importe quel procédé connu en la matière, tel que décrit dans "Current Protocols in Immunology" aux Editions Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E et Strober W., Wiley Interscience, 1992. Cette réaction est, de préférence, effectuée
35 à une température comprise entre 0° et 40°C, la (ou les) forme(s) de β 2GPI étant, de préférence, mise(s) dans un tampon ayant un pH

compris entre 2,5 et 10,5, avantageusement entre 5,5 et 7,5. On utilise, de préférence, un tampon isotonique ou presque isotonique. Le tampon peut être du type phosphate ou acétate. La solution obtenue a avantageusement une concentration comprise entre 0,01 et 100 g/l de forme(s) de β 2GPI. Le support est avantageusement maintenu en contact avec le tampon contenant la (ou les) forme(s) de β 2GPI à une température comprise entre 0 et 40°C et pendant un temps d'incubation compris entre 10 secondes et 24 heures. Après incubation, on sépare du support le tampon contenant la (ou les) forme(s) de β 2GPI n'ayant pas réagi et on effectue un lavage du support, de préférence, avec le même tampon que celui qui contenait la (ou les) forme(s) de β 2GPI. Il peut être nécessaire de saturer les sites actifs du support, qui n'ont pas réagi, avec la (ou les) forme(s) de β 2GPI. Dans ce cas, on fait réagir sur ces sites actifs d'autres groupes actifs choisis parmi les solutions d'albumine bovine, de sérum de veau fœtal, de caséine ou similaires. On utilise avantageusement, dans ce but, une solution d'albumine sérique bovine, en particulier une solution à 2% dans le tampon utilisé pour la (ou les) forme(s) de β 2GPI. Après réaction, le support est, de préférence, rincé et séché.

La réaction du support solide portant une (ou des) forme(s) de β 2GPI avec le matériau biologique se fait selon n'importe quel procédé connu en la matière tels que ceux décrits dans "Current Protocols in Immunology" aux Editions Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E et Strober W., Wiley Interscience, 1992. Le support sur lequel est (sont) fixée(s) la (ou les) forme(s) de β 2GPI est ensuite mis en contact avec un matériau biologique susceptible de contenir des PrP. On dilue, de préférence, le matériau biologique à l'aide d'un tampon donnant un pH compris entre 3,5 et 10, avantageusement compris entre 5,6 et 7,6. La réaction est, de préférence, effectuée à une température comprise entre 0° et 50°C, avantageusement voisine de 37°C, pendant une période de temps comprise entre 10 secondes et 24 heures. On peut séparer ensuite le matériau biologique du support portant la (ou les) forme(s) de β 2GPI, qui a (ou ont) éventuellement fixé au moins une PrP. On effectue éventuellement ensuite un lavage avec une solution, tamponnée de préférence.

Les mêmes conditions de fixation de (ou des) forme(s) de β 2GPI sur le support et de fixation de la (ou des) PrP sur la (ou les) forme(s) de β 2GPI que celles décrites précédemment peuvent être utilisées lorsque la fixation de la (ou des) forme(s) de β 2GPI sur le support est effectuée après la formation du complexe.

Lorsque le complexe est fixé sur le support par l'intermédiaire de sa partie β 2GPI, il est alors possible d'isoler la PrP. L'isolement de la partie PrP du complexe fixé sur le support solide par sa partie β 2GPI peut se faire selon n'importe quel procédé d'élution utilisé pour la chromatographie d'affinité, tels que ceux décrits dans "Guide to protein purification. Methods in enzymology", édité par Deutscher M., Academic Press, 1990. On sépare ou élue le matériau biologique du support solide contenant la (ou les) forme(s) de β 2GPI à l'aide d'un tampon ayant un pH compris entre 2 et 10,5, ayant une concentration en NaCl comprise entre 0 et 5M, avantageusement avec un tampon glycine-HCl, 0,1 mole/litre, ayant un pH de 2,5.

La détection et/ou l'identification et/ou la quantification des PrP fixées sur la (ou les) forme(s) de β 2GPI peuvent se faire par tout moyen connu utilisant la détection et/ou l'identification et/ou la quantification par des anticorps, tel que décrit dans "Current Protocols in Immunology" aux Editions Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E et Strober W., Wiley Interscience, 1992. Le terme "anticorps" ci-dessus utilisé se réfère à des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. Le terme "anticorps monoclonal" se réfère à une composition d'anticorps consistant en une population homogène d'anticorps ; ce terme n'est pas limité en regard de l'espèce productrice de cet anticorps ni de la source de sa provenance, ni de la manière dont il a été produit. La détection et/ou l'identification et/ou la quantification des PrP fixées sur la (ou les) forme(s) de β 2GPI se font, de préférence, à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement des antigènes, de préférence de nature protéique, des PrP. De façon connue, cet anticorps peut être conjugué à un marqueur enzymatique, à de l'or colloïdal, à un traceur radioactif, fluorescent ou luminescent. L'excès d'anticorps peut être éliminé par lavage. On peut ajouter ensuite, de façon connue, dans le cas où l'anticorps est couplé à un marqueur enzymatique, un substrat spécifique de l'enzyme conjuguée à l'anticorps, substrat qui se transforme, dans des

conditions fixées, en un produit coloré. La formation dudit composé coloré indique la présence de la PrP et permet son identification ainsi que sa quantification.

La détection et/ou l'identification et/ou la quantification des
5 PrP fixées sur la (ou les) forme(s) de β 2GPI peuvent se faire par tout moyen connu utilisant la détection et/ou l'identification et/ou la quantification par des procédés d'infection de cellules ou d'organismes susceptibles à l'infection par des PrP, tel que décrit dans "Fields Virology", Third Edition, Lippincott - Raven Publishers, 1996, ou
10 "Virology Methods Manual", édité par Mahy B., Kangro H., Academic Press, 1996.

Selon un deuxième mode de mise en œuvre de l'invention, dans le cas où l'on fixe le complexe sur un support, on retient le complexe PrP/ β 2GPI sur le support par l'intermédiaire de la partie PrP
15 dudit complexe ; ensuite, on détecte la partie β 2GPI dudit complexe par tout moyen approprié, avantageusement à l'aide d'anticorps spécifiques de la β 2GPI, conjugués notamment à un marqueur enzymatique, à de l'or colloïdal, à un traceur radioactif, fluorescent ou luminescent. La présence native ou le rajout de détergent(s) et/ou de lipide(s) peut aider
20 la fixation de ces anticorps. La fixation de la PrP sur le support peut être réalisée, avant ou après la formation du complexe, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour la fixation de β 2GPI sur le support, et la fixation de la β 2GPI sur la PrP pour former le complexe peut être réalisée dans les mêmes conditions que celles
25 décrites précédemment pour fixer la PrP sur la β 2GPI.

Dans une première variante des deux modes de mise en œuvre précités, on retient indirectement le complexe PrP/ β 2GPI par l'intermédiaire de la partie β 2GPI du complexe, en munissant le support d'un composé se liant à ladite partie de la β 2GPI ; ensuite la partie PrP
30 du complexe est détectée comme ci-dessus décrit. Le composé se liant à la β 2GPI peut être, par exemple, un anticorps reconnaissant la β 2GPI ou une autre protéine, par exemple d'origine virale ou cellulaire, procaryote ou eucaryote, ou un composé biologique, par exemple un acide gras ou un lipide, ou un composé chimique, par exemple le dextran sulfate,
35 l'héparine sulfate ou un détergent, tel que celui connu sous le nom commercial "TRITON X 100".

Dans une deuxième variante, on retient indirectement le complexe PrP/ β 2GPI par l'intermédiaire de la partie PrP dudit complexe en munissant le support d'un composé se liant à ladite partie PrP du complexe; ensuite on détecte et/ou identifie et/ou quantifie la partie β 2GPI dudit complexe comme décrit ci-dessus. Le composé se liant à la PrP peut être, par exemple, un anticorps reconnaissant la PrP ou une autre protéine, par exemple d'origine virale ou cellulaire, procaryote ou eucaryote, ou un composé biologique, par exemple un acide gras ou un lipide, ou un composé chimique, par exemple le dextran sulfate, l'héparine sulfate ou un détergent, tel que celui connu sous le nom commercial "TRITON X 100".

Dans ces deux variantes, la fixation indirecte de la (ou des) forme(s) de β 2GPI ou de la (ou des) PrP sur le support par l'intermédiaire d'un composé peut être effectuée, après ou avant la formation du complexe, dans des conditions similaires à celles décrites dans le cas d'une fixation directe.

Selon une autre mise en œuvre de l'invention, on utilise la (ou les) forme(s) de β 2GPI naturellement présente(s) dans un matériau biologique. Dans ce cas, on se propose de détecter et/ou d'identifier et/ou de quantifier des PrP lorsque ces PrP sont en quantité telle, par rapport à la β 2GPI naturellement présente dans le matériau biologique, qu'elles sont majoritairement complexées ou complexables à au moins une des formes de β 2GPI naturellement présentes. Dans ce cas, les formes de β 2GPI comprennent toutes formes de β 2GPI animale ou humaine naturellement présentes dans le matériau biologique. Le complexe naturellement formé dans le matériau biologique peut alors être fixé sur un support, directement ou indirectement, soit par sa partie PrP, soit par sa partie β 2GPI, la détection et/ou identification et/ou quantification du complexe étant réalisée par la partie du complexe non liée directement ou indirectement au support. Ce procédé peut permettre de détecter éventuellement un état initial de la pathologie, alors que le procédé selon la première mise en œuvre est plus approprié à l'étude d'un état de pathologie déclarée correspondant.

La description donnée ci-après, à titre d'exemples purement illustratifs et non limitatifs, permettra de mieux comprendre l'invention. Les exemples sont décrits en se référant au dessin annexé sur lequel :

- la figure 1 représente les résultats obtenus dans l'exemple 1 ;
- la figure 2 représente les résultats obtenus dans l'exemple 2 ; et
- la figure 3 représente les résultats obtenus dans l'exemple 4.

Obtention des formes de β 2GPI

5 On utilise, comme matière première de départ, un plasma ou un sérum d'origine humaine ou animale ou une protéine recombinante. Le plasma ou sérum animal est d'origine soit bovine, soit porcine, soit ovine.

10 La purification des formes de β 2GPI est réalisée soit selon le procédé décrit dans le brevet français 2 701 263 soit selon des procédés déjà décrits dans la littérature, notamment "Gambino R, Ruiiu G, Pagano G, Cassader M. Chem Phys Lipids, 1999 ; 103(1-2) : 161-74", "Regnault V, Arvieux J, Vallar L, Lecompte T. J Immunol Methods, 1998 ; 211(1-2):191-7", "Klaerke DA, Rojkjaer R, Christensen L, Schousboe I. Biochim Biophys Acta, 1997 ; 1339(2) : 203-16", "Cai G, Guo Y, Shi J. Protein Expr Purif, 1996 ; 8(3) : 341-6", "Gambino R, Ruiiu G, Cassader M, Pagano G. J Lipid Res, 1996 ; 37(4) : 902-4", "Williams SC, Sim RB. J Immunol Methods, 1993 ; 157(1-2) : 25-30", "McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Proc Natl Acad Sci U S A 1990 ; 87(11) : 4120-4", "Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984 ; 81(12) : 3640-4", ou "Lambin P, Burstein M. Biochimie, 1982;64(11-12) : 1065-71".

25 La séquence des 20 premiers acides aminés de la région N-terminale des formes de β 2GPI obtenues après purification ou après purification et fragmentation en polypeptides à l'aide d'enzymes protéolytiques a été déterminée par microséquençage à l'aide d'un appareil "Applied Biosystems Inc, modèle 470" couplé à un analyseur de phénylrhéohydantoïne modèle 120 A (ABI). Les séquences obtenues correspondent avec celles décrites dans la littérature et trouvées dans les

30 banques de données.

 Pour des raisons de commodité les formes de β 2GPI seront ci-après désignées par :

- **β 2GPI N** : β 2GPI native dont la séquence correspond à celle publiée par "T. KRISTENSEN et coll., FEBS Letters, Vol. 289, 1991, pages 183-186",
- 35

- **β '2GPI** : β 2GPI dont la séquence a été donnée dans le brevet français 2 701 263. Cette forme de β 2GPI porte la substitution Thr318Ser ;
- **β '2GPI carb.** : β '2GPI dont les résidus lysine ont été modifiés par carbamylation avec du cyanate de potassium à pH 5,8 pendant 4 heures à 37°C selon le procédé décrit par Means GE et Feeney RE, dans "Chemical modification of proteins, Holden-Day Inc, San Francisco, 1971: 215-216" ;
- **β 2GPI Bov** : β 2GPI purifiée à partir de sérum bovin ;
- **β 2GPI Por** : β 2GPI purifiée à partir de plasma de porc ;
- **β 2GPI Rec** : β 2GPI recombinante produite chez des cellules d'insectes après infection avec du baculovirus servant de vecteur du gène de la β 2GPI N ;
- **β 2GPI Pep1** : peptide correspondant à la séquence CKNEKKC de la β 2GPI et obtenu par synthèse chimique. Les deux cystéines sont reliées par un pont disulfure ;
- **β 2GPI Pep2** : peptide correspondant à la séquence CKNEKKC de la β 2GPI et obtenu par synthèse chimique. Les deux cystéines sont libres.

EXEMPLE 1

Des préparations tissulaires d'animaux infectés par l'agent de l'encéphalite spongiforme bovine (ESB) ont été réalisées comme décrit dans "Maignien T. et coll., Journal of General Virology, 1999, 80 : 3035-3042".

La PrP^{Sc} (protéine du prion responsable de la transmission de l'encéphalite spongiforme) a été purifiée, selon la référence précédente, par centrifugation en présence de détergents, après digestion par la protéinase K. Lors de ce traitement, la PrP^C est détruite par la protéinase K et le(s) détergent(s). Les échantillons purifiés ont par la suite été séparés sur un gel d'électrophorèse à 12% de polyacrylamide, en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS), puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell). La membrane a ensuite été saturée avec de l'albumine bovine à 2%, pendant 1 heure à température ambiante puis découpée en plusieurs bandelettes.

De la β '2GPI, β 2GPI N, β 2GPI carb. et β '2GPI Rec, couplées à de la phosphatase alcaline, ont été déposées sur ces bandelettes (essais 1, 3, 5, 7 respectivement) et, à titre de comparaison,

sur des bandelettes obtenues à partir de préparations tissulaires d'animaux non-infectés par l'agent de l'encéphalite spongiforme bovine (ESB) (essais 2, 4, 6, 8 respectivement).

L'expérience montrée par la figure 1 a été réalisée comme suit : les bandelettes ont été rincées trois fois avec du tampon acétate 50 mM, pH 5,6, Triton X100 0,05%. Un millilitre à 1 µg/ml des différentes formes de β 2GPI, dans du tampon acétate 50 mM, pH 5,6, gélatine 0,1%, Triton X 100 0,5%, a été ajouté sur chaque bandelette. Après une incubation d'une heure à température ambiante et sous agitation, les bandelettes ont été lavées 6 fois avec du PBS (tampon phosphate salin) contenant 0,05% de Triton X 100. La révélation des formes de β 2GPI fixées a été réalisée avec un mélange liquide de substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT).

La figure 1 montre qu'avec les différentes formes de β 2GPI, il est possible de détecter les PrP^{SC} dans le cas d'animaux infectés par l'agent de l'encéphalite spongiforme bovine (ESB).

EXEMPLE 2

De la protéine bovine recombinante PrP a été obtenue de la Société "Prionics". Le support solide utilisé est une plaque de microtitration de type "C8 Starwell Maxisorp" à 96 puits et à fond plat, commercialisée par la société "NUNC". L'expérience de fixation sur support solide sur lequel une des formes de β 2GPI a été fixée a été réalisée comme suit. La PrP bovine recombinante a été utilisée sur une gamme de concentrations allant de 0 à 2000 ng/puits. La dilution est effectuée à l'aide d'un tampon (Tris/HCl) ayant une concentration en Tris de 0,05 mole/l et un pH de $7,6 \pm 0,05$. On dépose 100 µl de solution au fond de chaque puits de la plaque. La plaque est incubée à +37°C pendant une période de 90 minutes. Après cette incubation, on effectue un lavage en introduisant 300 µl de tampon phosphate dans chaque puits, on laisse en contact pendant 2 minutes et on aspire la solution de tampon ; on renouvelle cette opération de lavage 4 fois.

La révélation de la PrP fixée sur les différentes formes de β 2GPI a été effectuée en utilisant une solution d'anticorps monoclonal 6H4, obtenue de la Société "Prionics". Cet anticorps monoclonal 6H4 est spécifique à la PrP.

On ajoute par puits 100 μ l d'une solution d'anticorps monoclonal 6H4 dilué 5000 fois en tampon phosphate salin (PBS). On laisse la plaque incuber à 37°C pendant 60 minutes. A la suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 μ l de tampon phosphate dans chaque puits et après un temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 4 fois.

On ajoute par puits 100 μ l d'une solution d'anticorps de lapin spécifique des IgG de souris, conjugué à la peroxydase. On laisse la plaque incuber à 37°C pendant 60 minutes. A la suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 μ l de tampon phosphate dans chaque puits et après un temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 6 fois.

On ajoute par puits 100 μ l d'une solution d'o-phénylène-diamine, 2HCl dans un tampon citrate de sodium. On laisse incuber pendant 30 minutes à température ambiante, puis on arrête la réaction en rajoutant à chaque puits 50 μ l de H₂SO₄, 2N. On mesure l'absorbance à 492 nm obtenue en fin de réaction à l'aide d'un robot lecteur de plaque.

Le tableau 1 et la figure 2 correspondante montrent que la PrP recombinante, dont la séquence est celle des deux formes de protéine prion PrP^C et PrP^{SC}, peut être détectée avec les différentes formes de β 2GPI. Le contrôle positif est de la PrP recombinante fixée sur support solide aux différentes concentrations notées dans le tableau 1 puis révélée avec la solution d'anticorps monoclonal 6H4. La BSA (albumine sérique bovine) sert de contrôle négatif démontrant que la liaison est spécifique aux formes de β 2GPI.

TABLEAU 1
Valeurs de densité optique (UDO x 1000)

Concentration PrP ng/puits	β 2GPI	β 2GPI Bov.	β 2GPI Por.	β 2GPI Pep1	β 2GPI Pep2	Témoin Positif	BSA
2000	3500	3500	3500	3500	3500	3500	42
1000	3500	3500	3500	3500	3500	3500	42
500	3458	3458	3458	3458	3458	3458	42
250	3648	3648	3648	3648	3648	3648	43
125	3521	3521	3521	3521	3521	3521	43
62.5	3542	3542	3542	3542	3542	3542	42
31.25	3215	3215	2915	2904	3215	3215	45
15.62	2985	3060	2650	2558	2965	2965	42
7.812	2315	2580	2310	2214	2212	2105	43
3.91	1856	1896	1782	1695	1746	1500	44
1.95	798	1005	698	649	956	785	43
0.98	463	564	369	322	452	256	42
0.49	286	365	195	188	298	185	42

EXEMPLE 3

De la protéine bovine recombinante PrP, identique à celle utilisée dans l'exemple 2, a été ajoutée dans du sérum humain.

Le support solide utilisé est une plaque de microtitration de type "C8 Starwell Maxisorp" à 96 puits et à fond plat, commercialisée par la société "NUNC". Diverses solutions de composés ont été fixées sur le support, à savoir une solution de protéines recombinantes p26-HIV2 ROD reconnaissant la β 2GPI, des anticorps monoclonaux reconnaissant la β 2GPI, du dextran sulfate, de l'héparine sulfate reconnaissant la protéine prion PrP ainsi que la β 2GPI, et des anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine prion PrP. La β 2GPI utilisée dans cet exemple est la β 2'GPI. Le sérum contenant la PrP bovine recombinante a été dilué 50 fois. La dilution est effectuée à l'aide d'un tampon (Tris/HCl) ayant une concentration en Tris de 0,05 mole/l et un pH de $7,6 \pm 0,05$. On dépose 100 μ l de solution au fond de chaque puits de la plaque. La plaque est incubée à $+37^{\circ}\text{C}$ pendant une période de 90 minutes. Après cette incubation, on effectue un lavage en introduisant 300 μ l de tampon phosphate dans chaque puits, on laisse en contact pendant 2 minutes et on aspire la solution de tampon ; on renouvelle cette opération de lavage 4 fois.

La révélation de la partie PrP du complexe a été effectuée en utilisant une solution d'anticorps monoclonal 6H4, obtenue de la Société "Prionics". La révélation de la partie β 2GPI du complexe a été effectuée en utilisant une solution d'anticorps monoclonal 8C3.

5 On ajoute par puits 100 μ l d'une solution d'anticorps monoclonal 6H4 ou 8C3 dilué 5000 fois en tampon phosphate salin (PBS). On laisse la plaque incuber à 37°C pendant 60 minutes. A la suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 μ l de tampon phosphate dans chaque puits et après un
10 temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 4 fois.

On ajoute par puits 100 μ l d'une solution d'anticorps monoclonal de souris spécifique des IgG de souris conjugué à la peroxydase. On laisse la plaque incuber à 37°C pendant 60 minutes. A la
15 suite de cette incubation, le contenu des puits de la plaque est aspiré. On introduit 300 μ l de tampon phosphate dans chaque puits et après un temps de contact de 2 minutes, on aspire le tampon : cette opération de lavage est renouvelée 6 fois.

On ajoute par puits 100 μ l d'une solution d'o-phénylène-
20 diamine, 2HCl dans un tampon citrate de sodium. On laisse incuber pendant 30 minutes à température ambiante, puis on arrête la réaction en rajoutant dans chaque puits 50 μ l de H₂SO₄, 2N. On mesure l'absorbance à 492 nm obtenue en fin de réaction à l'aide d'un robot lecteur de plaque.

La moyenne des absorbances obtenues pour chaque solution
25 de composé fixée sur le support est donnée par le tableau 2 (en unités de densité optique multipliées par 1000). Les résultats du tableau 2 démontrent que le complexe PrP/ β 2GPI peut être détecté selon le mode de la présente invention, et, en particulier, que la PrP recombinante peut être détectée.

TABLEAU 2
Valeurs de densité optique (UDO x 1000)

Composé fixé sur le support	Révélation de la partie β 2GPI du complexe	Révélation de la partie PrP du complexe
Héparine sulfate	1896	1756
P26-HIV2 ROD	-	1615
Dextran sulfate	1752	1459
Anticorps anti- β 2GPI ⁽¹⁾	-	1763
Anticorps anti-PrP ^{SC} (2)	1862	-
⁽¹⁾ anticorps monoclonaux 8C3		
⁽²⁾ anticorps monoclonaux 6H4		

5

EXEMPLE 4

Les protéines d'un sérum provenant d'un sujet sain ont été séparées sur un gel d'électrophorèse à 12 % de polyacrylamide, en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell). La membrane a été saturée avec du lait écrémé à 2 % en PBS (tampon phosphate salin), pendant 1 heure à température ambiante puis découpée en plusieurs bandelettes. De la protéine bovine recombinante PrP, identique à celle utilisée dans l'exemple 2, a été déposée de la manière suivante sur des bandelettes numérotées de 1 à 5 :

- 15 - 1 μ g de protéine bovine recombinante PrP, dans du PBS, a été déposé sur la bandelette 1 ;
- 1 μ g de protéine bovine recombinante PrP, dans du Tris 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, a été déposé sur les bandelettes 2 et 5 ;
- 20 - 1 μ g de protéine bovine recombinante PrP, dans du Tris 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, lysine 0,1 mole/l, a été déposé sur la bandelette 4 ;
- 1 μ g de protéine bovine recombinante PrP, dans du Tris 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, a été déposé sur la bandelette 3, qui avait au préalable été préincubée pendant 1 heure avec un anticorps monoclonal, le 8C3, dirigé contre la β 2GPI.
- 25

Après 1 heure d'incubation, sous agitation et à température ambiante, les bandelettes 1 à 5 ont été rincées 4 fois avec du PBS. Une solution d'anticorps monoclonal 6H4, dirigé contre la PrP, diluée 5 000 fois en tampon Tris HCl 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, gélatine 0,2 %, Tween 20 0,05 %, a été ajoutée aux bandelettes.

Une solution d'anticorps monoclonal 8C3 dirigé contre la β 2GPI, contenant 1 μ g d'anticorps/ml en tampon Tris HCl 0,05 ml/l, pH 7,6, NaCl 0,15 mole/l, gélatine 0,2 %, Tween 20 0,05 %, a été ajoutée sur une bandelette 6.

Après 1 heure d'incubation, sous agitation et à température ambiante, les bandelettes 1 à 6 ont été rincées quatre fois avec du PBS.

Finalement, les bandelettes 1 à 6, ainsi qu'une bandelette 7 destinée à servir de témoin négatif, ont été incubées pendant 1 heure, à température ambiante et sous agitation, en présence d'une solution d'anticorps de lapin couplés à la phosphatase alcaline et dirigés contre les anticorps de souris, dans du tampon Tris HCl 0,05 mole/l, pH 7,6, NaCl 0,2 mole/l, gélatine 0,2 %, Tween 20 0,05 %, puis rincées 6 fois avec du tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20. La révélation des anticorps a été réalisée avec un mélange liquide de substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT). Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.

La bandelette 6 de la figure 3 montre l'emplacement de la β 2GPI N avec une grosse tache au niveau des monomères et des taches plus faibles au niveau des dimères et polymères.

Les bandelettes 1, 2 et 5 montrent les protéines sériques liant la PrP recombinante. Ces protéines sont situées au même niveau que celles reconnues par l'anticorps monoclonal dirigé contre la β 2GPI.

La bandelette 3 montre que les protéines liant la PrP recombinante sont celles qui sont reconnues par l'anticorps monoclonal dirigé contre la β 2GPI (absence de signal après blocage de ces protéines).

Cette expérience montre que, parmi les protéines sériques, la β 2GPI N reconnaît et fixe la PrP recombinante.

REVENDICATIONS

1. Procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion (PrP), caractérisé par le fait qu'il comprend une
5 étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/ β 2GPI) formé d'au moins une protéine prion liée à au moins une forme de β 2-glycoprotéine I (β 2GPI).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou
10 d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP^{SC}/ β 2GPI) formé d'au moins une protéine prion anormale (PrP^{SC}) liée à au moins une forme de β 2GPI, ledit procédé constituant un procédé de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification dans un matériau biologique d'au moins une protéine prion anormale.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que, pour former un complexe (PrP^{SC}/ β 2GPI), on utilise au moins une
15 protéine prion anormale (PrP^{SC}) provenant de la tremblante du mouton ou de la chèvre, de l'encéphalopathie bovine, de la maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, des encéphalopathies des visons ou des chats, de la maladie de Creutzfeld-Jacob (MJC), du
20 syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), du kuru ou de l'insomnie familiale fatale.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé par le fait que, préalablement à l'étape de séparation et/ou de
25 détection et/ou d'identification et/ou de quantification du complexe (PrP^{SC}/ β 2GPI), on soumet le matériau biologique à l'action de détergents et/ou d'enzymes.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que, préalablement à l'étape de séparation et/ou de détection et/ou
30 d'identification et/ou de quantification du complexe (PrP^{SC}/ β 2GPI), on soumet le matériau biologique à l'action de la protéinase K.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que l'on utilise, pour former un complexe (PrP/ β 2GPI), au moins une β 2GPI d'origine humaine, ou d'origine
35 animale, une β 2GPI recombinante, ou une β 2GPI obtenue par synthèse chimique ou une forme modifiée de β 2GPI.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que l'on réalise une étape de fixation de PrP contenue dans un matériau biologique à au moins une forme de β 2GPI intentionnellement rajoutée audit matériau biologique pour former ledit complexe, suivie d'une étape de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification du complexe (PrP/ β 2GPI).

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que l'on réalise :

- une étape de fixation sur un support, d'au moins une forme de β 2GPI ou de ladite (ou desdites) PrP, avant ou après l'étape de fixation de ladite (ou desdites) PrP à ladite (ou auxdites) forme(s) de β 2GPI pour former ledit complexe,

- une étape de séparation consistant à séparer le matériau biologique du support, sur lequel est fixé le complexe,

- une étape de détection et/ou d'identification et/ou de quantification consistant, après ladite étape de séparation, à détecter et/ou à identifier et/ou à quantifier le complexe fixé au support par sa partie, qui n'est pas liée au support.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme support, un support solide.

10. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé par le fait que l'on effectue la fixation sur le support par l'intermédiaire d'un composé se liant à l'une des parties PrP ou β 2GPI du complexe, ladite étape de détection et/ou d'identification et/ou de quantification consistant à détecter et/ou à identifier et/ou à quantifier le complexe par sa partie, qui n'est pas liée au support.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que le composé se liant à la β 2GPI ou à la PrP est un anticorps reconnaissant respectivement la β 2GPI ou la PrP, ou bien une autre protéine, un composé biologique, un composé chimique ou un détergent se fixant à la PrP ou à la β 2GPI.

12. Procédé selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé par le fait que l'on réalise :

- l'étape de fixation d'au moins une forme de β 2GPI ou de la (ou des) PrP sur un support, par réaction de groupes réactifs de la (ou des) forme(s) de β 2GPI ou de la (ou des) PrP avec des sites réactifs du

support, ladite (ou lesdites) forme(s) étant mise(s) en solution dans un tampon ayant un pH compris entre 2,5 et 10,5, de préférence entre 5,5 et 7,5, pour obtenir une solution ayant une concentration comprise entre 0,01 et 100g/l de forme(s) de β 2GPI ou de PrP, le support étant maintenu
5 en contact avec la solution à une température comprise entre 0° et 40°C pendant un temps d'incubation compris entre 10 secondes et 24 heures, puis

- la séparation du support et de la solution par lavage du support.

10 13. Procédé selon l'une des revendications 7 à 12, caractérisé par le fait que l'étape de fixation d'au moins une PrP à au moins une forme de β 2GPI pour former un complexe est réalisée par mise en contact d'au moins une forme de β 2GPI, avec le matériau biologique susceptible de contenir des PrP à une température comprise
15 entre 0° et 50°C, avantageusement voisine de 37°C, pendant une période de temps comprise entre 10 secondes et 24 heures, le matériau biologique étant dilué à l'aide d'un tampon donnant un pH compris entre 3,5 et 10, de préférence compris entre 5,6 et 7,6.

20 14. Procédé selon l'une des revendications 7 à 13, caractérisé par le fait que l'on effectue la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la (ou des) PrP du complexe par des anticorps spécifiques de la (ou des) PrP, ou par des procédés d'infection de cellules ou d'organismes susceptibles à l'infection des PrP.

25 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé par le fait que l'on effectue la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la (ou des) PrP du complexe par un anticorps reconnaissant spécifiquement un antigène, de préférence de nature protéique, de la (ou des) PrP.

30 16. Procédé selon l'une des revendications 7 à 13, caractérisé par le fait que l'on effectue la détection et/ou l'identification et/ou la quantification de la β 2GPI du complexe par des anticorps spécifiques de la β 2GPI.

35 17. Procédé selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisé par le fait que l'on couple l'anticorps à un marqueur enzymatique, à de l'or colloïdal, à un traceur radioactif, fluorescent ou luminescent.

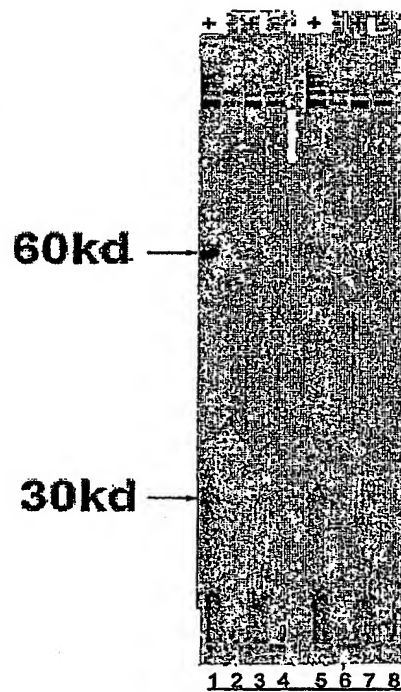
18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé par le fait que l'on couple l'anticorps à un marqueur enzymatique, dont l'enzyme est mise en contact à un substrat spécifique apte à se transformer en un produit coloré.

5 19. Procédé selon l'une des revendications 8 à 15, caractérisé par le fait que l'on fixe le complexe au support par l'intermédiaire de sa partie β 2GPI, l'étape de séparation comprenant l'isolement de la PrP du complexe fixé au support par un procédé d'élution de chromatographie d'affinité.

10 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que ledit isolement est réalisé par élution de la PrP fixée au support solide à l'aide d'un tampon ayant un pH compris entre 2 et 10,5, une concentration en NaCl comprise entre 0 et 5M, de préférence à l'aide d'un tampon glycine-HCl 0,1 mole/litre ayant un pH de 2,5.

15 21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de séparation et/ou de détection et/ou d'identification et/ou de quantification d'au moins une PrP dans un matériau biologique qui contient naturellement au moins une forme de β 2GPI, caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de séparation et/ou de détection et/ou
20 d'identification et/ou de quantification d'un complexe (PrP/ β 2GPI) formé d'au moins une PrP liée à au moins une forme de β 2GPI naturellement présente dans ledit matériau.

1/2



- 1, 2: β '2GPI,
- 3, 4: β 2GPI N,
- 5, 6: β 2GPI carb.,
- 7, 8: β '2GPI Rec

FIGURE 1

2/2

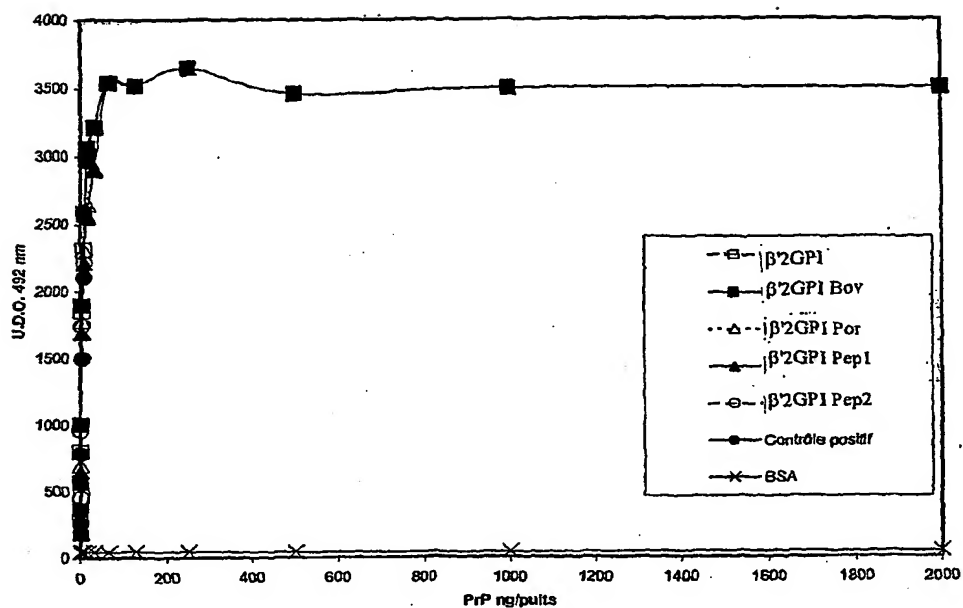


FIGURE 2

1 2 3 4 5 6 7

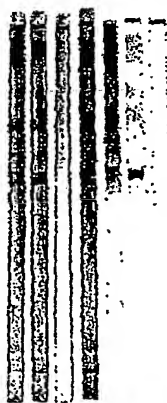


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No
PCT/FR 02/02292A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68 C12Q1/37 G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 17249 A (MINI AGRICULTURE & FISHERIES ; DAWSON MICHAEL (GB); MARTIN TREVOR C) 6 June 1996 (1996-06-06) the whole document	1-21
A	HOCHSTRASSER D F ET AL: "Elevation of apolipoprotein E in the CSF of cattle affected by BSE" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 416, no. 2, 20 October 1997 (1997-10-20), pages 161-163, XP004261330 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-21



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the International filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 September 2002

Date of mailing of the international search report

09/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gunster, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/02292

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DANDROY-DRON R ET AL: "GENE EXPRESSION IN SCRAPIE CLONING OF A NEW SCRAPIE-RESPONSIVE GENE AND THE IDENTIFICATION OF INCREASED LEVELS OF SEVEN OTHER MRNA TRANSCRIPTS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 273, no. 13, 27 March 1998 (1998-03-27), pages 7691-7697, XP000941399 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-21
A	WO 94 18569 A (STEFAS ELIE ; RUCHETON MARCEL (FR); GRAAFLAND HUBERT (FR)) 18 August 1994 (1994-08-18) cited in the application the whole document	1-21
A	FR 2 690 444 A (RUCHETON MARCEL ; GRAAFLAND HUBERT; STEFAS ELIE) 29 October 1993 (1993-10-29) cited in the application the whole document	1-21
A	FR 2 701 263 A (RUCHETON MARCEL; GRAAFLAND HUBERT; STEFAS ELIE) 12 August 1994 (1994-08-12) the whole document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/02292

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9617249	A	06-06-1996	AU 3932895 A	19-06-1996
			CA 2205179 A1	06-06-1996
			CZ 9701642 A3	12-11-1997
			EP 0795132 A1	17-09-1997
			FI 972253 A	28-07-1997
			WO 9617249 A1	06-06-1996
			GB 2308659 A ,B	02-07-1997
			HU 77340 A2	30-03-1998
			NO 972339 A	22-05-1997
			NZ 295721 A	29-03-1999
			SK 67897 A3	14-02-2000
WO 9418569	A	18-08-1994	FR 2701319 A1	12-08-1994
			AT 152523 T	15-05-1997
			DE 69402961 D1	05-06-1997
			DE 69402961 T2	14-08-1997
			DK 683897 T3	27-10-1997
			EP 0683897 A1	29-11-1995
			ES 2101508 T3	01-07-1997
			WO 9418569 A1	18-08-1994
			US 5650269 A	22-07-1997
FR 2690444	A	29-10-1993	FR 2690444 A1	29-10-1993
			AU 4263493 A	18-11-1993
			CA 2134115 A1	28-10-1993
			EP 0637317 A1	08-02-1995
			WO 9321228 A1	28-10-1993
			US 5677424 A	14-10-1997
FR 2701263	A	12-08-1994	FR 2701263 A1	12-08-1994
			EP 0683791 A1	29-11-1995
			WO 9418228 A1	18-08-1994
			US 5859213 A	12-01-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D le Internationale No
PCT/FR 02/02292

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/68 C12Q1/37 G01N33/566		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 17249 A (MINI AGRICULTURE & FISHERIES ;DAWSON MICHAEL (GB); MARTIN TREVOR C) 6 juin 1996 (1996-06-06) le document en entier	1-21
A	HOCHSTRASSER D F ET AL: "Elevation of apolipoprotein E in the CSF of cattle affected by BSE" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 416, no. 2, 20 octobre 1997 (1997-10-20), pages 161-163, XP004261330 ISSN: 0014-5793 le document en entier	1-21
--- -/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">27 septembre 2002</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">09/10/2002</div>	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Gunster, M</div>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Di le Internationale No
PCT/FR 02/02292

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DANDROY-DRON R ET AL: "GENE EXPRESSION IN SCRAPIE CLONING OF A NEW SCRAPIE-RESPONSIVE GENE AND THE IDENTIFICATION OF INCREASED LEVELS OF SEVEN OTHER MRNA TRANSCRIPTS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 273, no. 13, 27 mars 1998 (1998-03-27), pages 7691-7697, XP000941399 ISSN: 0021-9258 le document en entier	1-21
A	WO 94 18569 A (STEFAS ELIE ;RUCHETON MARCEL (FR); GRAAFLAND HUBERT (FR)) 18 août 1994 (1994-08-18) cité dans la demande le document en entier	1-21
A	FR 2 690 444 A (RUCHETON MARCEL ;GRAAFLAND HUBERT; STEFAS ELIE) 29 octobre 1993 (1993-10-29) cité dans la demande le document en entier	1-21
A	FR 2 701 263 A (RUCHETON MARCEL;GRAAFLAND HUBERT; STEFAS ELIE) 12 août 1994 (1994-08-12) le document en entier	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D le Internationale No

PCT/FR 02/02292

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9617249	A	06-06-1996	AU 3932895 A	19-06-1996
			CA 2205179 A1	06-06-1996
			CZ 9701642 A3	12-11-1997
			EP 0795132 A1	17-09-1997
			FI 972253 A	28-07-1997
			WO 9617249 A1	06-06-1996
			GB 2308659 A ,B	02-07-1997
			HU 77340 A2	30-03-1998
			NO 972339 A	22-05-1997
			NZ 295721 A	29-03-1999
			SK 67897 A3	14-02-2000
WO 9418569	A	18-08-1994	FR 2701319 A1	12-08-1994
			AT 152523 T	15-05-1997
			DE 69402961 D1	05-06-1997
			DE 69402961 T2	14-08-1997
			DK 683897 T3	27-10-1997
			EP 0683897 A1	29-11-1995
			ES 2101508 T3	01-07-1997
			WO 9418569 A1	18-08-1994
			US 5650269 A	22-07-1997
FR 2690444	A	29-10-1993	FR 2690444 A1	29-10-1993
			AU 4263493 A	18-11-1993
			CA 2134115 A1	28-10-1993
			EP 0637317 A1	08-02-1995
			WO 9321228 A1	28-10-1993
			US 5677424 A	14-10-1997
FR 2701263	A	12-08-1994	FR 2701263 A1	12-08-1994
			EP 0683791 A1	29-11-1995
			WO 9418228 A1	18-08-1994
			US 5859213 A	12-01-1999